

日本国特許庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日
Date of Application: 2003年 3月26日

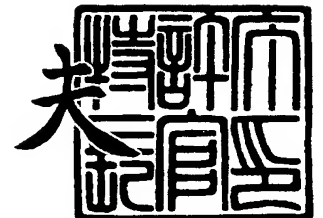
出願番号
Application Number: 特願2003-086362
[ST. 10/C]: [JP 2003-086362]

出願人
Applicant(s): セイコーエプソン株式会社

2004年 1月21日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今井康夫



出証番号 出証特2004-3001619

【書類名】 特許願

【整理番号】 J0097966

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 C12Q 1/68
C07H 21/04
C12Q 1/70

【発明者】

【住所又は居所】 長野県諏訪市大和 3 丁目 3 番 5 号 セイコーエプソン株式会社内

【氏名】 瀧口 宏志

【特許出願人】

【識別番号】 000002369

【氏名又は名称】 セイコーエプソン株式会社

【代理人】

【識別番号】 100079108

【弁理士】

【氏名又は名称】 稲葉 良幸

【選任した代理人】

【識別番号】 100080953

【弁理士】

【氏名又は名称】 田中 克郎

【選任した代理人】

【識別番号】 100093861

【弁理士】

【氏名又は名称】 大賀 真司

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 011903

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9808570

【プルーフの要否】 要

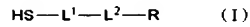
【書類名】 明細書

【発明の名称】 核酸固定化方法およびそれを用いるバイオセンサの製造法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 核酸を固相基板上に固定化するための核酸固定化方法であって、プローブとしての核酸および式

【化 1】

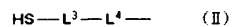


〔式中、 L^1 は単結合または C_{1-15} アルキレン基を、 L^2 は単結合、核酸、ポリエチレングリコール基、 $-\text{CO}-\text{NH}-$ または $-\text{NH}-\text{CO}-$ を、 R は水酸基、アミノ基、フェロセニル基またはカルボキシル基を示す；ただし、 L^1 および L^2 が共に単結合である場合を除く（以下、化合物（I）と略記する）〕で表される化合物またはその塩を合計濃度で $0.1 \sim 2 \mu\text{M}$ 含む組成物と、前記固相基板とを接触させてインキュベートすること含む、前記核酸固定化方法。

【請求項 2】 前記核酸が、それぞれ修飾されていてもよく且つ一本鎖である DNA、RNA、PNA、CNA もしくは HNA からなるポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドを含む核酸プローブである、請求項 1 記載の方法。

【請求項 3】 前記核酸が、3' 末端または 5' 末端に式

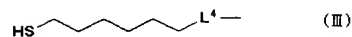
【化 2】



〔式中、 L^3 は C_{1-15} アルキレン基を、 L^4 は単結合またはスペーサーを示す〕で表される基を有する核酸である、請求項 1 記載の方法。

【請求項 4】 前記核酸が 5' 末端に式

【化 3】



〔式中の L^4 は前記定義と同義である〕で表される基を有する核酸である、請求項 1 記載の方法。

【請求項 5】 前記 L^4 が核酸、 $-\text{CO}-\text{NH}-$ 、 $-\text{NH}-\text{CO}-$ 、ポリエチレングリコール基またはポリエチレングリコールリン酸基である、請求項 4 記載の方法。

【請求項 6】前記組成物における核酸および化合物 (I) またはその塩の合計濃度が $0.5 \sim 1.5 \mu\text{M}$ である請求項 1 記載の方法。

【請求項 7】前記組成物における核酸および化合物 (I) またはその塩の合計濃度が $1 \mu\text{M}$ である請求項 1 記載の方法。

【請求項 8】前記組成物における核酸および化合物 (I) またはその塩の組成比が $40/60 \sim 60/40$ である、請求項 1 記載の方法。

【請求項 9】前記式 (I) における R が水酸基である、請求項 1 記載の方法。

【請求項 10】前記式 (I) における L^1 が単結合で、 L^2 がポリエチレングリコール基である、請求項 1 記載の方法。

【請求項 11】前記式 (I) における L^1 が C_4-8 アルキレン基で、 L^2 が単結合である、請求項 1 記載の方法。

【請求項 12】前記化合物 (I) が 6-メルカプト-1-ヘキサノールである請求項 1 記載の方法。

【請求項 13】前記固相基板が、ガラス、ポリマー樹脂および金属のうち少なくとも 1 つの材料を含む単層または多層基板である、請求項 1 記載の方法。

【請求項 14】前記固相基板における核酸の吸着面が金膜である、請求項 1 記載の方法。

【請求項 15】前記固相基板が、表面を金薄膜で蒸着したガラス基板であり、かつ更に、前記金薄膜とガラス材料との間に少なくとも 1 つの介在層が施されている、請求項 1 記載の方法。

【請求項 16】固相基板上に固定化される核酸の塩基長が $15 \sim 30$ 塩基長である、請求項 1 記載の方法。

【請求項 17】前記インキュベートの温度が $25 \sim 40^\circ$ である、請求項 1 記載の方法。

【請求項 18】プローブとしての核酸が、それぞれ前記式 (II) で表される基を有していてもよく且つ一本鎖である DNA、RNA もしくは PNA からなるポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドで；

前記化合物 (I) が 6-メルカプト-1-ヘキサノールで；

前記組成物における核酸および6-メルカプト-1-ヘキサノールの合計濃度が0.5~1.5 μ Mで、並びに、

前記固相基板が、表面を金薄膜で蒸着したガラス基板であり、かつ更に、前記金薄膜とガラス材料との間に少なくとも1つの介在層が施されていてもよい、請求項1記載の方法。

【請求項19】請求項1~18のいずれか1項に記載の核酸固定化方法を用いることを含む、センシング部位として核酸プローブを有するバイオセンサの製造法。

【請求項20】核酸および前記化合物(I)またはその塩を合計濃度で0.5~1.5 μ M含む組成物と、固相基板とを接触させてインキュベートする工程を経ることにより製造される、センシング部位として核酸プローブを有するバイオセンサ。

【請求項21】前記化合物(I)が6-メルカプト-1-ヘキサノールで、前記固相基板が表面を金薄膜で蒸着したガラス基板であり、かつ更に、前記金薄膜とガラス材料との間に少なくとも1つの介在層が施されていてもよい基板である、請求項20記載のバイオセンサ。

【請求項22】測定可能なシグナルを検出することにより被検試料中の標的核酸分子を検出する方法であって、(a)請求項1記載の核酸固定化方法を用いることにより製造された核酸プローブを有するバイオセンサと、前記被検試料とを接触させてインキュベートする工程と；(b)前記工程(a)の前後に渡って連続または断続的に、前記バイオセンサの固相基板に対して、核酸固定面とは逆の面から光を照射する工程と；(c)前記工程(b)における入射光の反射光を検出して前記固相基板の屈折率の変化を測定する工程と、を含む核酸分子検出方法。

【請求項23】DNA、RNAまたはそれらの一塩基多型検出のための、請求項22記載の核酸分子検出方法。

【請求項24】センシング部位として核酸プローブを有するバイオセンサ製造のための、核酸および前記化合物(I)またはその塩を合計濃度で0.5~1.5 μ M含む組成物の使用。

【請求項25】請求項24記載の使用に供する前記組成物製造のための、核

酸および前記化合物 (I) またはその塩の使用。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】

本発明は、核酸固定化方法、および、それを用いるバイオセンサの製造法と核酸検出方法に関する。

【0002】

【従来の技術】

標的核酸分子の検出と配列解析および遺伝子マッピングの手法として、近年、核酸プローブを用いるマイクロアレイ技術などのバイオセンサが広く用いられている。代表例であるハイブリダイゼーション法は、相補核酸鎖の相互作用（ハイブリダイゼーション）を利用し核酸プローブによって標的核酸分子を固定化し、直接または間接的に（例：検体に付与された蛍光分子の発光強度による検出）該標的核酸分子の存在を判別して配列の全部または一部を解析する方法である。通常、標的核酸分子の全部または一部をその配列とする 1 本鎖核酸分子がプローブとして用いられ、該プローブを固相基板上に固定化（例えば、共有結合、イオン結合、吸着、生物特異的結合）することにより、標的核酸分子の検出用担体を形成する。従って、固相基板上に固定化された核酸が高密度であるほどハイブリダイゼーションによって捕獲できる核酸の量も化学量論的には増加するはずである。しなしながら、核酸同士の間隔が狭すぎると、逆にハイブリダイゼーションの阻害を招くおそれがあり、即ち、核酸分子を最も多く効率的に固相基板表面で捕獲するためには、核酸プローブの密度と間隔を最適に調整すべく、制御する必要がある。

固相基板上に核酸を固定化する方法には、主に、(1)基板表面にて核酸伸長反応を行う、即ち基板上で直接核酸プローブを合成する方法、(2)核酸固定化工程の前に予め核酸プローブを合成しておいてから当該プローブを基板表面に固定化する方法、等が用いられる。

上記(1)における例としては、(1a)保護基を有するリンカーが結合した担体を

基板上に固定化しておき、マス킹しつつ該担体を光照射して脱保護し、これと保護基を有する単量体核酸とを反応させ結合を形成させる工程を繰返し行う、光リソグラフィ技術；(1b)二段階マス킹技術；(1c)マスクなしで鏡面反射により光線を直接反応部位に照射し、目的とする核酸プローブを合成する技術、等が、上記(2)における例として、核酸分子の末端にリンカーを挟んで特定の基を結合させ、担体上に吸着させる方法（吸着法）、等が知られる。

【0003】

上記吸着法を用いる場合、スペーサー分子と呼ばれる比較的低分子を核酸プローブ間に挿入することが一般的に行われる。前記スペーサー分子には、通常、バイオセンサ動作に影響の無いような低分子が適しているとされ、核酸プローブの密度及びプローブ同士の間隔を最適化する等重要な役割を担うと考えられている。従来から、末端にチオール基を有する一部のアルカンチオール化合物が、自己組織化単分子膜（Self-Assembled Monolayer, SAM）の形成に使用できること、ならびに、吸着面として金を用いるとチオール基が金-イオウ結合によって固定化され、SAMの形成が起きることが知られており、例えば、末端をチオール化した一本鎖DNAの吸着試験に、6-メルカプト-1-ヘキサノールをスペーサー分子として用いることに関する報告がある（例えば、非特許文献1参照）。

吸着法には埋め込み法、共吸着法、置換法、等が知られていた。埋め込み法とは、はじめに核酸プローブを平衡状態になるまで固相基板に高密度吸着させ、その後、スペーサー分子を残った隙間に埋め込むという2段階の工程を含む成膜法であり、置換法とは、吸着させたスペーサー分子を核酸プローブで置き換えることにより成膜する方法である。

しかしながら、埋め込み法には、最初の核酸プローブの吸着工程において核酸プローブの密度を全く制御できないという問題がある。かかる問題を解消する手段として、核酸プローブを吸着させる時間を制御することに関する報告があるが（例えば、非特許文献1参照）、反応時間という極めて不安定なパラメータで、効果的な核酸密度の制御を行うことは極めて困難であった。また、スペーサー分子の埋め込み工程で、先に吸着した核酸プローブの密度が変化すると報告があり（例えば、非特許文献2参照）、密度調整には不適な方法である。更に、置換

法には、成膜時間がかかり過ぎるために実用的ではないという問題があった。一方、共吸着法は、核酸プローブを含む複数種類の分子が混合している溶液に固相基板を浸漬させ、前記分子の混合比率を変えることにより該固相基板に対する分子の吸着量を調整する方法で、最初に混合溶液の組成比率の調整を行うだけで、理論的にはバイオセンサにおける核酸プローブの密度を調節することができる。

【0004】

【非特許文献1】

Tonya M. Herne et al., Journal of American Chemical Society, 119, pp. 8916-8920 (1997)

【非特許文献2】

A. B. Steel et al., Biophysical Journal, Vol. 79, pp. 975-981 (2000)

【0005】

【発明が解決しようとする課題】

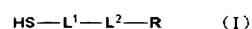
6-メルカプト-1-ヘキサノール等のスペーサー分子の吸着速度は、核酸分子のそれに対して極めて速く、混合溶液中の核酸分子を相当高濃度にしないと最適な密度での吸着が困難であるとの問題がある。また、核酸プローブの構造によって両者の相対的吸着速度が変化しやすいことが、核酸密度の調整をより一層困難且つ煩雑にしている。即ち、本発明の目的は、これらの問題点を解消し、プローブとしての核酸を固相基板表面に最適な密度で吸着させるための効果的且つ優れた共吸着法を提供することにある。

【0006】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは精力的に研究を重ねた結果、核酸プローブ分子と式

【化4】



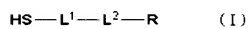
〔式中、 L^1 は単結合または C_{1-15} アルキレン基を、 L^2 は核酸、ポリエチレングリコール基、 $-\text{CO}-\text{NH}-$ または $-\text{NH}-\text{CO}-$ を、 R は水酸基、アミノ基、フェロセニル基またはカルボキシル基を示す；ただし、 L^1 および L^2 が

共に単結合である場合を除く（以下、化合物（I）と略記する）〕で表されるスペーサー分子またはその塩とを合計濃度で $0.1 \mu\text{M} \sim 2 \mu\text{M}$ 含む組成物を用いて共吸着法を行うと、予想外にも、極めて良好な密度で核酸プローブを固定化することができる上に、組成物における核酸プローブの組成割合の微調整が極めて容易で、結果として核酸プローブの固定化密度の調整をプローブとスペーサー分子の組み合わせに依存することなく極めて容易に行えることを見出し、本発明を完成した。

【0007】

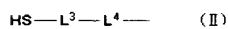
即ち、本発明は、〔1〕核酸を固相基板上に固定化するための核酸固定化方法であって、プローブとしての核酸および式

【化5】



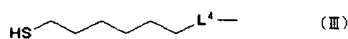
〔式中、 L^1 は単結合または C_{1-15} アルキレン基を、 L^2 は核酸、ポリエチレングリコール基、 $-\text{CO}-\text{NH}-$ または $-\text{NH}-\text{CO}-$ を、 R は水酸基、アミノ基、フェロセニル基またはカルボキシル基を示す；ただし、 L^1 および L^2 が共に単結合である場合を除く（以下、化合物（I）と略記する）〕で表される化合物またはその塩を合計濃度で $0.1 \sim 2 \mu\text{M}$ 含む組成物と、前記固相基板とを接触させてインキュベートすること含む、前記核酸固定化方法；〔2〕前記核酸が、それぞれ修飾されていてもよく且つ一本鎖である DNA、RNA、PNA、CNA もしくは HNA からなるポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドを含む核酸プローブである、前記〔1〕記載の方法；〔3〕前記核酸が、3' 末端または 5' 末端に式

【化6】



〔式中、 L^3 は C_{1-15} アルキレン基を、 L^4 は単結合またはスペーサーを示す〕で表される基を有する核酸である、前記〔1〕記載の方法；〔4〕前記核酸が 5' 末端に式

【化7】



〔式中の L^4 は前記定義に同義である〕で表される基を有する核酸である、前記〔1〕記載の方法；〔5〕前記 L^4 が核酸、 $-CO-NH-$ 、 $-NH-CO-$ 、ポリエチレングリコール基またはポリエチレングリコールリン酸基であるである、前記〔4〕記載の方法；〔6〕前記組成物における核酸および化合物（I）またはその塩の合計濃度が $0.5 \sim 1.5 \mu M$ である前記〔1〕記載の方法；〔7〕前記組成物における核酸および化合物（I）またはその塩の合計濃度が $1 \mu M$ である前記〔1〕記載の方法；〔8〕前記組成物における核酸および化合物（I）またはその塩の組成比が $40/60 \sim 60/40$ である、前記〔1〕記載の方法；〔9〕前記式（I）における R が水酸基である、前記〔1〕記載の方法；〔10〕前記式（I）における L^1 が単結合で、 L^2 がポリエチレングリコール基である、前記〔1〕記載の方法；〔11〕前記式（I）における L^1 が C_4-8 アルキレン基で、 L^2 が単結合である、前記〔1〕記載の方法；〔12〕前記化合物（I）が 6-メルカプト-1-ヘキサノールである前記〔1〕記載の方法；〔13〕前記固相基板が、ガラス、ポリマー樹脂および金属のうち少なくとも 1 つの材料を含む単層または多層基板である、前記〔1〕記載の方法；〔14〕前記固相基板における核酸の吸着面が金膜である、前記〔1〕記載の方法；〔15〕前記固相基板が、表面を金薄膜で蒸着したガラス基板であり、かつ更に、前記金薄膜とガラス材料との間に少なくとも 1 つの介在層が施されているともよい、前記〔1〕記載の方法；〔16〕固相基板上に固定化される核酸の塩基長が $15 \sim 30$ 塩基長である、前記〔1〕記載の方法；〔17〕前記インキュベートの温度が $25 \sim 40^\circ$ である、前記〔1〕記載の方法；〔18〕プローブとしての核酸が、それぞれ前記式（II）で表される基を有していてもよく且つ一本鎖である DNA、RNA もしくは PNA からなるポリヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドで、前記化合物（I）が 6-メルカプト-1-ヘキサノールで、前記組成物における核酸および 6-メルカプト-1-ヘキサノールの合計濃度が $0.5 \sim 1.5 \mu M$ で、並びに、前記固相基板が、表面を金薄膜で蒸着したガラス基板であり、かつ更に、前記金薄膜とガラス材料との間に少なくとも 1 つの介在層が施されているともよい、前記〔1〕記載の方法；〔19〕前記〔1〕～〔18〕のいずれか 1 項に記載の核酸固定化方法を用いることを含む、センシング部位として核酸

プローブを有するバイオセンサの製造法；[20] 核酸および前記化合物 (I) またはその塩を合計濃度で $0.5 \sim 1.5 \mu\text{M}$ 含む組成物と、固相基板とを接触させてインキュベートする工程を経ることにより製造される、センシング部位として核酸プローブを有するバイオセンサ；[21] 前記化合物 (I) が 6-メルカプト-1-ヘキサノールで、前記固相基板が表面を金薄膜で蒸着したガラス基板であり、かつ更に、前記金薄膜とガラス材料との間に少なくとも 1 つの介在層が施されていてもよい基板である、前記 [20] 記載のバイオセンサ；[22] 測定可能なシグナルを検出することにより被検試料中の標的核酸分子を検出する方法であって、(a) 前記 [1] 記載の核酸固定化方法を用いることにより製造された核酸プローブを有するバイオセンサと、前記被検試料とを接触させてインキュベートする工程と；(b) 前記工程 (a) の前後に渡って連続または断続的に、前記バイオセンサの固相基板に対して、核酸固定面とは逆の面から光を照射する工程と；(c) 前記工程 (b) における入射光の反射光を検出して前記固相基板の屈折率の変化を測定する工程と、を含む核酸分子検出方法；[23] DNA、RNA またはそれらの一塩基多型検出のための、前記 [22] 記載の核酸分子検出方法；[24] センシング部位として核酸プローブを有するバイオセンサ製造のための、核酸および前記化合物 (I) またはその塩を合計濃度で $0.5 \sim 1.5 \mu\text{M}$ 含む組成物の使用；[25] 前記 [24] 記載の使用に供する前記組成物製造のための、核酸および前記化合物 (I) またはその塩の使用、に関する。

【0008】

本発明にかかる「核酸固定化方法」において用いる核酸分子およびスペーサー分子またはその塩は、固相基板表面との吸着反応に付する前に予め混合され組成物を形成してから用いられ、通常は、溶液として使用される。本発明において用いられる前記組成物には、前記核酸分子とスペーサー分子またはその塩とが、合計濃度で通常 $0.1 \sim 5 \mu\text{M}$ 含まれ、かかる範囲内の濃度である限りにおいて、核酸プローブによる固相基板の被覆を良好な状態で完了させることができる。中でも好適な合計濃度は $0.1 \sim 2 \mu\text{M}$ 、より好適には $0.5 \mu\text{M} \sim 1.5 \mu\text{M}$ 、更に好適には $0.5 \mu\text{M} \sim 約 1 \mu\text{M}$ で、最も好適には $約 1 \mu\text{M}$ である。即ち、本発明にかかる核酸固定化方法において、プローブとしての核酸分子とスペーサー

分子またはその塩とを、約 $1\ \mu\text{M}$ の合計濃度で使用した時に、最も良好な吸着が得られる。

【0009】

前記混合溶液における核酸分子とスペーサー分子またはその塩との組成比（モル％）は特に限定されず、目的とするバイオセンサ上の核酸の密度、核酸プローブの構造、使用するスペーサー分子、使用する固相基板の種類に応じて当業者が適宜選択することができる。核酸分子／スペーサー分子＝約 1 モル％／約 99 モル％～約 99 モル％／約 1 モル％の範囲に含まれる組成比を有する核酸分子およびスペーサー分子を含む混合溶液であれば目的に応じていかなる組成比も実施可能である。本発明にかかる核酸固定化方法によれば、従来法の如き高濃度の核酸分子が不要であり、核酸分子とスペーサー分子の組成比が 50／50（モル％比）前後で最も効率的に核酸分子の吸着を達成することができる。言うまでも無く、核酸分子／スペーサー分＝約 1／99～約 10／90、約 10／90～約 20／80、約 20／80～約 30／70、約 30／70～約 40／60、約 40／60～約 50／50、約 50／50～約 60／40、約 60／40～約 70／30、約 70／30～約 80／20、約 80／20～約 90／10、約 90／10～約 99／1（以上、モル％濃度比）のいずれの範囲においても混合及び組成の微調整が可能であり、固相基板の被覆が達成される。

【0010】

本発明において用いる核酸プローブ溶液およびスペーサー分子溶液それぞれの調製法、並びに両溶液の混合法は、いずれも特に限定されず、両者を溶解し且つ固相基板表面への吸着反応を阻害しない限りにおいては如何なる溶媒・混合法をも使用することができる。例えば、混合溶液における核酸プローブとスペーサー分子の合計濃度を $X\ \mu\text{M}$ （ X は 0.1～5 である）にしたい場合は、核酸プローブ溶液およびスペーサー分子溶液を別々にそれぞれ $X\ \mu\text{M}$ の濃度で調製し、適宜目的の比率で両者を混合することにより、目的とする $X\ \mu\text{M}$ の混合溶液を調製することができる。前記核酸プローブ溶液とスペーサー分子溶液の調製において用いる好適な溶媒としては、各種リン酸緩衝液（例えば PBS（50 mM KPO_4 、5 mM EDTA、1 M NaCl、pH 7.0）、等）、TE 緩衝液（T

ris-HClとEDTAの混合緩衝液、pH 8.0)、等があげられる。当該緩衝液のpHも特に限定されないが、通常、pH 5.5～8.5付近であり、好適にはpH 7～8付近である。ここで、前記緩衝液にはNaCl等の塩類（好適にはNaCl）を含ませることにより、良好に高密度な固定化を行うこともできる。

【0011】

本発明において用いる「塩」とは、スパーサー分子と塩を形成できるものであれば特に限定されず、如何なる塩の形態であってもよい。具体的には、無機酸の付加塩（例えば塩酸塩、硫酸塩、炭酸塩、重炭酸塩、臭化水素酸塩、ヨウ化水素酸塩等）；有機カルボン酸の付加塩（例えば酢酸塩、マレイン酸塩、乳酸塩、酒石酸塩、トリフルオロ酢酸塩等）；有機スルホン酸の付加塩（例えばメタンスルホン酸塩、ヒドロキシメタンスルホン酸塩、ヒドロキシエタンスルホン酸塩、ベンゼンスルホン酸塩、トルエンスルホン酸塩、タウリン塩等）；アミンの付加塩（例えばトリメチルアミン塩、トリエチルアミン塩、ピリジン塩、プロカイン塩、ピコリン塩、ジシクロヘキシルアミン塩、N,N'-ジベンジルエチレンジアミン塩、N-メチルグルカミン塩、ジエタノールアミン塩、トリエタノールアミン塩、トリス（ヒドロキシメチルアミノ）メタン塩、フェネチルベンジルアミン塩等）；アミノ酸の付加塩（例えばアルギニン塩、リジン塩、セリン塩、グリシン塩、アスパラギン酸塩、グルタミン酸塩等）、等があげられる。

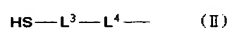
【0012】

本発明にかかる核酸固定化方法における「核酸」とは、それぞれ一部または全部が修飾（置換を含む）されていてもよく、且つ更にそれぞれ1本鎖または2本鎖である、オリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドを意味し、好ましくはそれぞれ一部または全部が修飾（置換を含む）されていてもよい1本鎖のオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドである。当該「核酸」における好適な例をあげると、DNA、RNA、PNA（ペプチド核酸）、CNA（アミノシクロヘキシルエタン酸核酸）、HNA（ヘキシトール核酸）、p-RNA（ピラノシルRNA）、前記核酸分子からなるオリゴヌクレオチド、前記核酸分子からなるポリヌクレオチド、等から選ばれる核酸である。前記核酸にはSNPs（一塩基多型

) も含まれる。

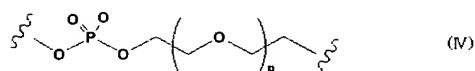
また、当該「核酸」とは、その分子末端に固相基板表面への吸着に適した基を有する分子を意味し、基板への吸着に適した基であれば特に限定されないが、好適な例としては式

【化 8】



〔式中、 L^3 は C_{1-15} アルキレン基を、 L^4 は単結合またはスペーサーを示す〕で表される 3' 末端または 5' 末端に結合する基があげられる。前記 L^3 における C_{1-15} アルキレン基とは、炭素数 1 から 15 のアルキレン基（具体例： $-\text{CH}_2-$ 、 $-(\text{CH}_2)_2-$ 、 $-(\text{CH}_2)_3-$ 、 $-(\text{CH}_2)_4-$ 、 $-(\text{CH}_2)_5-$ 、 $-(\text{CH}_2)_6-$ 、 $-(\text{CH}_2)_7-$ 、 $-(\text{CH}_2)_8-$ 、 $-(\text{CH}_2)_9-$ 、 $-(\text{CH}_2)_{10}-$ 、 $-(\text{CH}_2)_{11}-$ 、 $-(\text{CH}_2)_{12}-$ 、 $-(\text{CH}_2)_{13}-$ 、 $-(\text{CH}_2)_{14}-$ 、 $-(\text{CH}_2)_{15}-$) を意味し、特に限定されないが好適には C_{4-11} アルキレン基であり、より好適には C_{4-8} アルキレン基であり、更に好適には式 $-(\text{CH}_2)_6-$ で表される C_6 アルキレン基である。前記 L^4 は単結合でも他のスペーサーであってもどちらでもよいが、好適には単結合、ポリエチレングリコールを含む基（例えばポリエチレングリコール基、ポリエチレングリコールリン酸基、等）、核酸、 $-\text{CO}-\text{NH}-$ 、 $-\text{NH}-\text{CO}-$ であり、より好適には式

【化 9】



〔式中の p は 1 ~ 10 の整数を示す〕で表される基である。

式 (II) で表される基における好適な例は、 L^3 が C_{4-8} アルキレン基で、且つ L^4 が単結合または式 (IV) で表される基である場合で、より好適な例は L^3 が $-(\text{CH}_2)_6-$ で、且つ L^4 が単結合または式 (IV) で表される基において p が整数 6 である場合、である。

【0013】

本発明において用いる核酸プローブに含まれる塩基の長さは、目的に応じて異

なり特に限定されないが、好適には4～50塩基分の核酸を有する核酸プローブであり、より好適には10～35塩基長、更に好適には10～30塩基長の核酸を有する核酸プローブである。

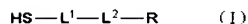
【0014】

なお、本発明において用いる「核酸プローブ」とは、前記「核酸」の定義と同義である。

【0015】

本発明において用いるスペーサー分子は、核酸分子と混合して溶液とすることが可能であり、固相基板表面に固定化された核酸プローブの機能を阻害せず、また、バイオセンサとしての動作に影響を与えない低分子物質である限りにおいて特に限定されず、目的とするバイオセンサ上の核酸の密度、核酸プローブの構造、使用するスペーサー分子、使用する固相基板の種類に応じて当業者が適宜選択することができる。好適な例をあげれば、末端にチオール基を有する低分子化合物であり、より好適には例えば式

【化10】



〔式中、 L^1 は単結合または C_{1-15} アルキレン基を、 L^2 は核酸、ポリエチレングリコール基、 $-\text{CO}-\text{NH}-$ または $-\text{NH}-\text{CO}-$ を、 R は水酸基、アミノ基、フェロセニル基またはカルボキシル基を示す；ただし、 L^1 および L^2 が共に単結合である場合を除く〕で表されるアルカンチオール化合物またはその塩があげられる。前記化合物 (I) における好適な例をあげると、 R が水酸基であるヒドロキシアルカンチオール化合物であり、より好適には L^1 が C_{4-11} アルキレン基で、 L^2 が単結合で、 R が水酸基であるヒドロキシアルカンチオール化合物であり、更に好適には式 $\text{HS}-(\text{CH}_2)_6-\text{OH}$ で表される6-メルカプト-1-ヘキサノールである。後に記載する図1に、核酸プローブとスペーサー分子とを共吸着反応に付して形成した固相基板表面の模式図を示す。

【0016】

本発明において用いる「固相基板」とは、核酸固定化を妨げない基板である限りにおいて特に限定されず、如何なる固相基板をも用いることができる。当該「

固相基板」の材料、層の数と種類およびそれらの厚さの選択は、固定化される核酸分子における吸着に供される基の種類、標的核酸分子の検出のために採用するシグナル検出手段等に依存して、当業者が最適な条件を適宜選択することが可能である。基板材料として好適な例をあげると、ガラス基板、金属基板（例えば金、銀、銅、アルミニウム、白金、酸化アルミニウム、 SrTiO_3 、 LaAlO_3 、 NdGaO_3 、 ZrO_2 等）、シリコン基板（例えば酸化ケイ素）、ポリマー樹脂基板（例えばポリエチレンテレフタレート、ポリカーボネート）、等から選ばれる材料である。

本発明において用いる固相基板は、前記材料のうちの単一の材料からなる基板であってもよいし、1つの基板材料（第1の基板）の表面に別種類の少なくとも1つの材料からなる薄膜（第1の層）を形成していてもよいし、更に、前記第1の基板と前記第1の層との間に少なくとも1つの他の介在層（第2の層、第3の層、等）が存在していてもよい。好適な「固相基板」の具体例をあげると、前記第1の基板としてガラス基板を用い、前記第1の層として表面に金属膜（好適には金薄膜、銀薄膜、銅薄膜、白金薄膜）を有する前記ガラス基板、等があげられる。なお、前記ガラス基板と前記金属膜との間には、他の材料からなる介在層が施されていてもよい。

前記第1の層をはじめとする各金属膜（好適には金薄膜、銀薄膜、銅薄膜、白金薄膜）の形成は、自体公知またはそれに準じた方法により可能である。例えば電気めっき法、無電解めっき法、スパッタ法、蒸着法、イオンプレーティング法、等により形成させることができる。前記金属膜表面が、汚染（例えば大気中の有機物）されている場合は、通常、金属膜表面を有機溶剤で洗浄し、更に必要に応じて、強酸で洗浄することによる分解除去、紫外線により発生するオゾン等による分解除去、等の方法を用いて汚染を除去する。好適な例としては、金属表面を有機溶剤（例えばアセトン等）で煮沸洗浄し、次いで該金属をUVオゾン洗浄器にて洗浄する方法、piranha溶液（過酸化水素水／濃硫酸＝30／70の混合溶液）を用いる洗浄方法があげられる。

本発明において用いる「固相基板」の厚さは特に限定されないが、通常、前記第1の基板であれば0.1mm～30mm程度であり、好適には0.1mm～2

0 mm程度である。前記第2、第3の層等であれば通常1~2000 nm、好適には1~1000 nm、より好適には100~500 nmである。

【0017】

本発明にかかる「核酸固定化方法」において、核酸とスペーサー分子とを含む混合溶液を固相基板と接触させインキュベートする場合の反応温度は、特に限定されないが、通常、0~40℃付近であり、好適には20~35℃付近である。反応時間も特に限定されないが、通常、30分~24時間のインキュベートで十分であり、好適には1時間~12時間である。

【0018】

本発明は、前記「核酸固定化方法」を用いることを含む、バイオセンサの製造法、並びに、前記「核酸固定化方法」を用いることを含む、核酸分子検出方法をも提供するが、当該製造法および核酸分子検出方法において用いられる各種条件は、前記定義に同義である。

本発明にかかるバイオセンサの製造法により製造されるバイオセンサは、1 cm²あたり少なくとも1 x 10²個~1 x 10¹⁶個の核酸分子を有するバイオセンサで、好適には少なくとも4 x 10²個~1 x 10¹⁵個の核酸分子を有するバイオセンサである。

【0019】

本発明にかかる「核酸分子検出方法」とは、本発明にかかる核酸固定化方法または製造法により得たバイオセンサを用いて、被検試料に含まれる標的核酸分子またはその類縁体を捉えることにより、当該標的分子の存在の有無を判別する方法を意味し、更には、標的核酸分子の配列を解析する工程を含んでなる判別方法であってもよい。本検出法は、特に、DNA（cDNAを含む）のオリゴヌクレオチド、ポリヌクレオチド；RNA（mRNA等）のオリゴヌクレオチド、ポリヌクレオチド；それらの核酸の一塩基多型（Single Nucleotide Polymorphism, SNPs）、等の検出に有用である。前記「標的核酸分子またはその類縁体を捉える」方法は、特に限定されないが、好適な例はハイブリダイゼーション法である。

【0020】

本発明にかかる「測定可能なシグナルを検出することにより被検試料中の標的核酸分子を検出する方法」、或いは、本発明にかかる「核酸固定化方法」または「バイオセンサ製造法」によって得られるバイオセンサの使用において用いられる、好適な「測定可能なシグナルを検出」するための手段には、例えば、表面プラズモン共鳴（SPR）を用いる手段；標的核酸分子等を蛍光分子標識して発光強度の変化を検出する手段、等があげられ、特に限定されないが、より好適な手段をあげれば、表面プラズモン共鳴（SPR）を用いる手段である。本発明にかかる核酸分子検出方法により、標的核酸分子を効率的に検出することができる。

表面プラズモン共鳴（SPR: Surface Plasmon Resonance）とは、固相基板において核酸が固定化された部材面と反対側の面から、臨界角以上の角度で光を入射し、その反射光強度の変化を検出して減衰から核酸固定面の屈折率を求め、被検試料を分析する手段である。本発明におけるシグナル検出手段として表面プラズモン共鳴（SPR）を用いる場合、表面プラズモン共鳴を起こす方法としては光ファイバー、プリズム、回折格子、光導波路等を用いる光学系を使用することができ、その材料、即ちバイオセンサにおける固相基板材料としては、ガラス、ポリマー樹脂、プラスチック等を使用することができる。表面プラズモン共鳴における測定の対象は、光の波長であっても入射反射の角度であってもよく、光源としてはLED、LD、白色光等を、検出器としてはCCD、PD、光位置センサー等を用いることができる。

標的核酸分子等の蛍光分子標識により検出する方法を用いる場合における前記蛍光分子の好適例をあげると、FITC (Fluorescein isothiocyanate)、RITC (Rhodamine isothiocyanate)、TMRITC (Tetramethyl rhodamine isothiocyanate)、Cy3 (Carboxymethyl indocyanin)、PE (Phycoerythrin) 等の蛍光分子がある。ここにおいて、FITCとPEは、反応後退色防止剤を使用しても退色が起きることから、遮光手段（例えばアルミホイルで遮光する等）を用いて低温で保存するのが好ましい。その他、標識用の蛍光物質として、量子ドット物質（Quantum Dot）物質（Warren C.W. Chan and Shunming Nie, Quantum Dot Bioconjugates for Ultrasensitive Nonisotopic Detection, Science 281, 2016 (1998)）を使用することもできる。該量子ドットとは、数nm～数100nm程度の微小半導体領域をい

い、電子 1 個の挙動を動作原理とするものであり、前記量子ドット物質として好適な例をあげると、例えば ZnS、CdSe 等、化合物半導体の微粒子を含む物質があげられる。これらは UV レーザによる励起で蛍光を発し、粒子サイズによってその波長が変化するが、一方で励起波長が一定であるため、一度のレーザ励起によって多色の蛍光染色が可能であり、有効である。

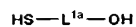
【0021】

本発明において用いる核酸プローブは、市販の商品として入手可能であるか、自体公知またはそれに準じた方法により容易に製造できる。例えば、市販の商品として入手する場合は、通常、個体粉末で購入入手することができる。また、本発明において用いるスペーサー分子も、市販の商品として入手可能であるか、自体公知またはそれに準じた方法により容易に製造できる。

【0022】

本願明細書において用いる語句の意義、並びに本発明の詳細な説明は以上の通りであるが、本発明への理解を更に容易にすべく、本発明の特徴を以下に記載する。まず、本発明の第 1 の特徴は、核酸を固相基板表面に固定化する方法において、核酸とスペーサー分子またはその塩とを合計濃度で約 0.1 ～ 約 5 μ M 含む組成物、好適には約 0.1 ～ 約 2 μ M 含む組成物、最も好適には合計濃度で約 1 μ M 含む組成物を、前記固相基板と接触させることにある。前記スペーサー分子として好適なのは式

【化 11】



〔式中、 L^1 は $\text{C}_4 - 8$ アルキレン基を示す〕で表されるアルカンチオール化合物またはその塩で、最も好適には 6-メルカプト-1-ヘキサノールである。核酸とスペーサー分子とを含む組成物として好ましいのは各種リン酸緩衝液 (pH 5.5 ～ 8.5 付近であり、好適には pH 7 付近) である。固相基板として最も好適な組み合わせにかかる基板は、ガラス基板表面に金薄膜を蒸着した基板である。

本発明の第 2 の特徴は、本発明にかかる前記「核酸固定化方法」を用いることを含むバイオセンサの製造法にある。当該製造法により製造されるバイオセンサ

は、最適高密度で核酸プローブが固定化されたバイオセンサであり、前記核酸密度は高低両方にわたり微調整が容易である。

更に、本発明の第3の特徴は、本発明にかかる前記「核酸固定化方法」または「バイオセンサの製造法」を用いることを含む製造法により得られたバイオセンサを用いることを含む、標的核酸分子検出方法にある。当該検出方法の実施においては、前記の如く優れたバイオセンサを使用することができるが、更に、例えば表面プラズモン共鳴（SPR）を用いて標的核酸の捕獲及び存在を検出することによって、より高精度且つ効率的に標的核酸分子を検出することができる。特に、前記表面プラズモン共鳴（SPR）を用いることにより、バイオセンサによる標的核酸分子の捕獲を経時的に連続して把握することが可能である。

本発明により、優れた核酸固定化方法、当該固定化方法を用いることを含むバイオセンサの製造法、および当該固定化方法を用いることを含む標的核酸分子検出法を提供することができる。本発明にかかる核酸固定化方法によれば、僅か1回の工程で、核酸プローブを最適な密度で固定化することができる他、核酸プローブを基板から立ち上がらせること、汚れが基板表面に付着するのを防止すること、電気化学的な絶縁性を付与すること、等も可能である。本方法によれば、核酸プローブとスペーサー分子の混合濃度を固定化反応前に調整するだけで、極めて容易にバイオセンサの密度調整を行うことができる。

【0023】

【実施例】

以下に示す本発明の参考例、実施例および試験例は例示的なものであり、本発明は以下の具体例に制限されるものではない。当業者は、以下に示す実施例に様々な変更を加えて本発明を最大限に実施することができ、かかる変更は本願特許請求の範囲に包含される。

【0024】

実施例1

＜核酸プローブの固定化のために混合液および固相基板の調製＞

(1) 核酸プローブ: 固相基板への吸着に供する核酸プローブとして、式（dA） $20-(CH_2-O-CH_2)_nPO_4-(CH_2)_6-SH$ で表される

核酸プローブを購入入手した。ここで、dAとはデオキシアデノシン5'-リン酸を意味する。

(2) スペーサー分子: スペーサー分子として、6-メルカプト-1-ヘキサノール (MCH) を購入入手し用いた。

(3) 緩衝液の調製: PBS緩衝液 (50 mM KPO_4 、5 mM EDTA、1 M NaCl、pH 7.0) を調製し用いた。核酸プローブとスペーサー分子は、別個に前記PBS緩衝液に溶解させておき、それぞれ $1\ \mu\text{M}$ 、 $10\ \mu\text{M}$ の2種類の溶液を用意した。

(4) 固相基板の調製: 前記製造法に準じて、表面に金薄膜を有するガラス基板を調製し、固相基板として用いた。

【0025】

実施例 2

<核酸プローブとMCHの共吸着>

(1) 共吸着: 実施例1で調製した核酸プローブ溶液とスペーサー分子溶液 (それぞれ $1\ \mu\text{M}$ 、 $10\ \mu\text{M}$ の2通り) とを、 $1\ \mu\text{M}$ 溶液同士および $10\ \mu\text{M}$ 同士、それぞれモル%比にして核酸/MCH = 25/75、50/50、75/25 の3通りで混合し、混合溶液を調製した。当該混合溶液に、表面の清浄な固相基板を浸漬し、1~3時間インキュベートした。観察角度を固定した状態のSPR装置で、前記基板からの反射光強度を測定した。

(2) 結果:

図2に、核酸プローブの吸着過程をSPR測定の反射光の変化量で評価した結果を示す。反射光の強度変化は、屈折率の変化あるいは膜厚の増減に関連する。 $10\ \mu\text{M}$ で共吸着させた場合には初期の屈折率変化が非常に大きく、その変化が穏やかで、しかもリンスによって表面に吸着したかなりの部分が洗い流されていることが示された。リンス後のreflectivityが、吸着の初期にみられた屈曲点とはほぼ同じ強度であることから、本反応条件における成膜が最初の1分程で終了してしまっていることが示され、6-メルカプト-1-ヘキサノールが優先的に吸着していったと考えられる。リンス操作により殆どの核酸プローブが除去されたと考えられる。

一方、 $1\ \mu\text{M}$ の低濃度における共吸着では、吸着過程のreflectivityの増加が緩やかで、吸着がゆっくり進行していることが示された。最終的变化量が大きく、リンスによるreflectivityの減少、即ち、膜圧の減少が少ない。

【0026】

実施例 3

＜核酸プローブとMCHの共吸着およびハイブリダイゼーション-1＞

(1) 核酸プローブ、スペーサー分子、緩衝液、固相基板の調製は前記実施例 1 に記載の通りである。

(2) 共吸着： 実施例 1 で調製した核酸プローブ溶液とスペーサー分子溶液（それぞれ $10\ \mu\text{M}$ ）とを、モル%比にして核酸/MCH = 25/75、50/50、80/20、90/10 の 4 通りで混合し、混合溶液を調製した。当該混合溶液に、表面の清浄な固相基板を浸漬し、1～3 時間インキュベートした。

(3) ハイブリダイゼーション反応： PBS 緩衝液に相補的な DNA（標的 DNA 分子：dT20）を DNA 濃度 $1\ \mu\text{M}$ になるように溶解させ、当該 DNA 溶液を上記 (2) で作製した共吸着膜基板の上に接触させ、ハイブリダイゼーション反応を起こさせた。

(4) 結果：

図 3 に、核酸プローブの吸着の程度およびハイブリダイゼーションのレベルを SPR 測定 of 反射光の変化量で評価した結果を示す。反射光の強度変化は、屈折率の変化しいては膜厚の増減に関連する。核酸プローブが組成比で 90% の場合によく基板の被覆化が達成され、また、ハイブリダイゼーションが有意に生じたのも、90% の組成比からであった。これは、MCH の吸着が優先的に起きているために生じたものであると考えられた。

【0027】

実施例 4

＜核酸プローブとMCHの共吸着およびハイブリダイゼーション-2＞

(1) 核酸プローブ、スペーサー分子、緩衝液、固相基板の調製は前記実施例 1 に記載の通りである。

(2) 共吸着： 実施例 1 で調製した核酸プローブ溶液とスペーサー分子溶液

(それぞれ $1\ \mu\text{M}$) とを、モル%比にして核酸/MCH = 25/75、50/50、75/25の3通りで混合し、混合溶液を調製した。当該混合溶液に、表面の清浄な固相基板を浸漬し、1～3時間インキュベートした。

(3) ハイブリダイゼーション反応： 実施例3に記載の方法と同様にして、ハイブリダイゼーション反応を行った。

(4) 結果：

図4に、核酸プローブの吸着の程度およびハイブリダイゼーションのレベルをSPR測定 of 反射光の変化量で評価した結果を示す。反射光の強度変化は、屈折率の変化しいては膜厚の増減に関連する。合計濃度 $1\ \mu\text{M}$ では50%前後でハイブリダイゼーションによる屈折率変化が最大になる。 $10\ \mu\text{M}$ の混合液を固定化反応に供した結果とは異なり、核酸プローブの最適比率が非常に制御し易いことが示された。

【0028】

実施例5

<共吸着およびハイブリダイゼーションにおける溶液濃度依存性>

(1) 核酸プローブ、スペーサー分子、緩衝液、固相基板の調製は前記実施例1に記載の通りである。

(2) 共吸着： 実施例1で調製した核酸プローブ溶液とスペーサー分子溶液(それぞれ $1\ \mu\text{M}$ と $10\ \mu\text{M}$ の2通り) とを、 $1\ \mu\text{M}$ 溶液同士および $10\ \mu\text{M}$ 同士、それぞれモル%比にして核酸/MCH = 50/50で混合し、混合溶液を調製した。実施例3または4に準じて共吸着反応およびハイブリダイゼーション反応を行い、SPR測定によって固定基板表面の屈折率変化を見た。

(3) 結果：

図5に、核酸プローブおよび6-メルカプト-1-ヘキサノールの共吸着およびハイブリダイゼーションの膜形成をSPR測定 of 反射光の変化量で評価した結果を示す。反射光の強度変化は、屈折率の変化しいては膜厚の増減に関連する。核酸プローブおよび6-メルカプト-1-ヘキサノールの混合溶液の濃度依存性を、図5に示す。濃度 $10\ \mu\text{M}$ では、吸着により得られた屈折率変化が小さく吸着した膜自体が薄いことが考えられた。その結果、ハイブリダイゼーションによ

る変化が極めて小さかった。

【0029】

実施例 6

<単純 DNA プローブおよび単純 6-メルカプト-1-ヘキサノール膜形成の濃度依存性>

(1) 核酸 (DNA) プローブ、6-メルカプト-1-ヘキサノール、緩衝液、固相基板の調製は前記実施例 1 に記載の通りである。

(2) 膜形成試験： 核酸プローブ溶液は、核酸濃度が $1\ \mu\text{M}$ になるように、また、6-メルカプト-1-ヘキサノール含有溶液は、6-メルカプト-1-ヘキサノール濃度がそれぞれ $10\ \mu\text{M}$ 、 $5\ \mu\text{M}$ 、 $1\ \mu\text{M}$ になるように 3 種類、調製した。それぞれの溶液に固相基板を浸漬し、QCM (Quartz crystal microbalance) 測定により水晶発振周波数の変化の検出を行った。

(3) 結果：

図 6 に核酸プローブと 6-メルカプト-1-ヘキサノールの膜形成を QCM 測定の振動数の変化量で評価した結果を示す。振動数の変化量は質量数の変化量ひいては吸着した分子数の増減に対応する。 $1\ \mu\text{M}$ の濃度にすることで、DNA と 6-メルカプト-1-ヘキサノールの吸着速度を同等に調整できることがわかった。

【0030】

以上の結果から、核酸プローブと 6-メルカプト-1-ヘキサノールとを合計濃度で $1\ \mu\text{M}$ 含む混合液を固相基板表面への固定化反応に供した場合、濃度 $10\ \mu\text{M}$ の場合に比べ、比較的低濃度の核酸プローブを用い 1 回の工程で高密度 (即ち最適密度) を得ることができた。また、これによってハイブリダイゼーションレベルが上昇し、多数の標的核酸分子を一度に検出することができるようになった。

【0031】

【図面の簡単な説明】

【図 1】 核酸プローブおよび 6-メルカプト-1-ヘキサノールが共吸着した固相基板表面を示す図である。

【図2】 核酸プローブの固相基板表面への共吸着過程を表面プラズモン共鳴（SPR）で検証した結果を示す図である。

【図3】 核酸プローブと6-メルカプト-1-ヘキサノールの合計濃度 $10\ \mu\text{M}$ の場合における固相基板表面への共吸着とハイブリダイゼーションを、組成比別に表面プラズモン共鳴（SPR）で検証した結果を示す図である。

【図4】 核酸プローブと6-メルカプト-1-ヘキサノールの合計濃度 $1\ \mu\text{M}$ の場合における固相基板表面への共吸着とハイブリダイゼーションを、組成比別に表面プラズモン共鳴（SPR）で検証した結果を示す図である。

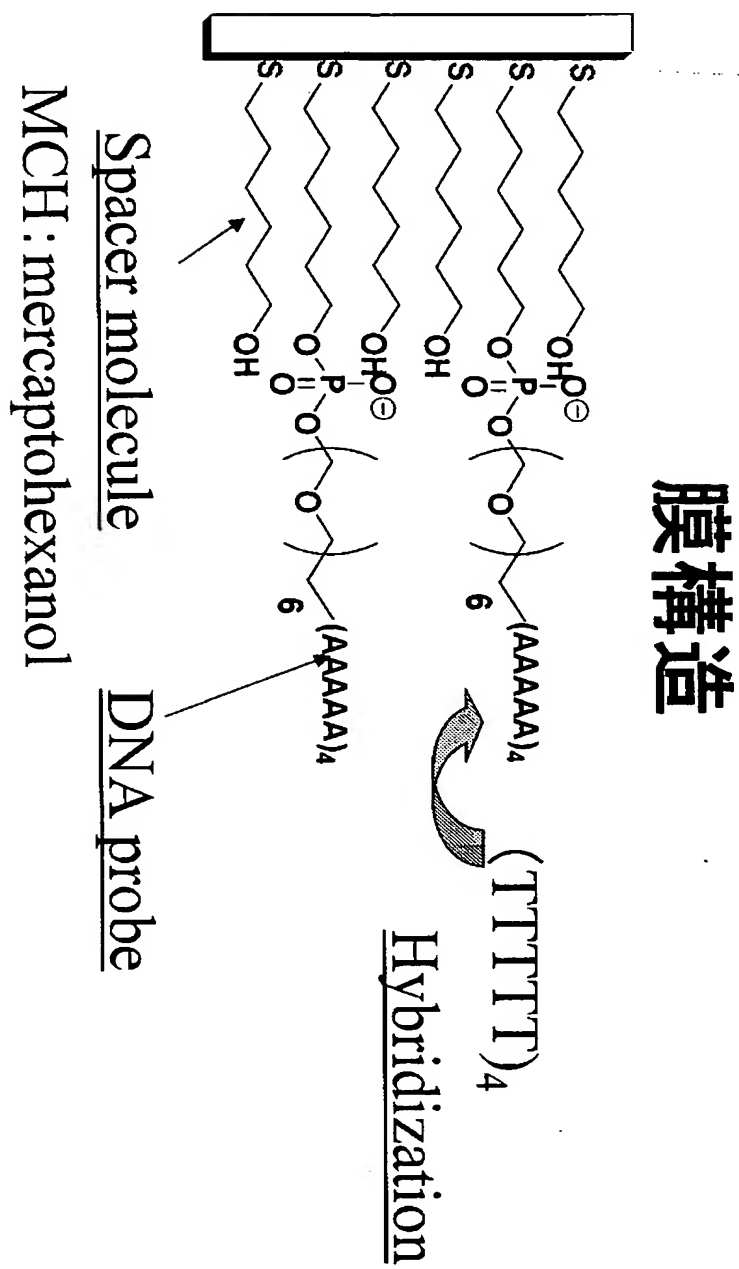
【図5】 核酸プローブと6-メルカプト-1-ヘキサノールの合計濃度の変化がハイブリダイゼーション反応に与える影響をSPRで評価した結果を示す図である。

【図6】 核酸プローブと6-メルカプト-1-ヘキサノールの単純膜形成における濃度依存性をQCM測定で評価した結果を示す図である。

【書類名】

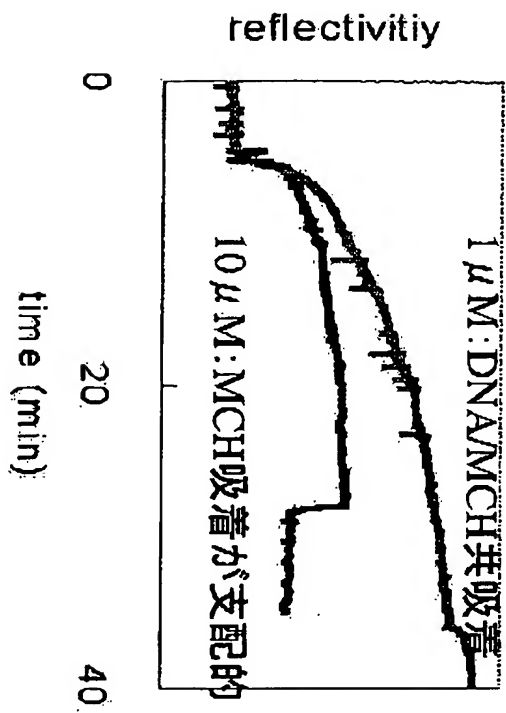
図面

【図 1】



単分子膜形成過程のSPR測定結果

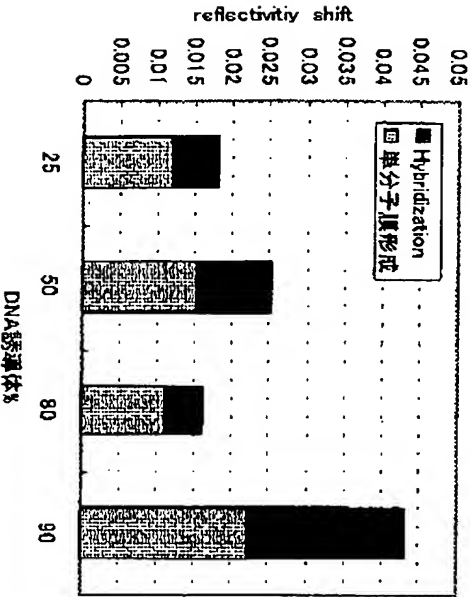
DNA/(DNA+MCH)=0.5



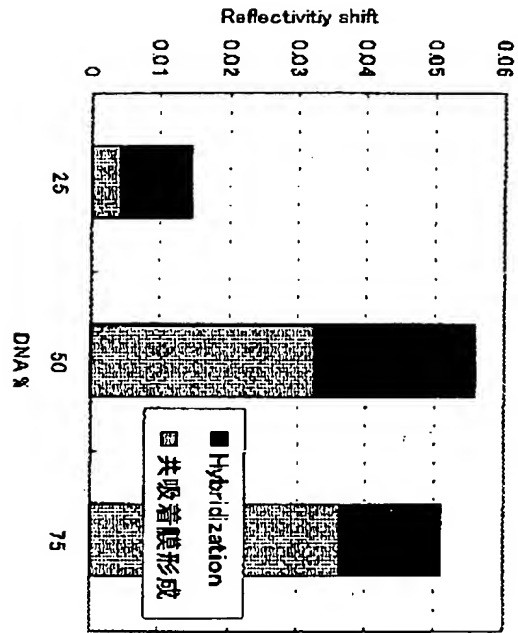
【図 2】

【図 3】

10μMにおけるハイブリダイゼーションの
DNAプローブ混合比依存性

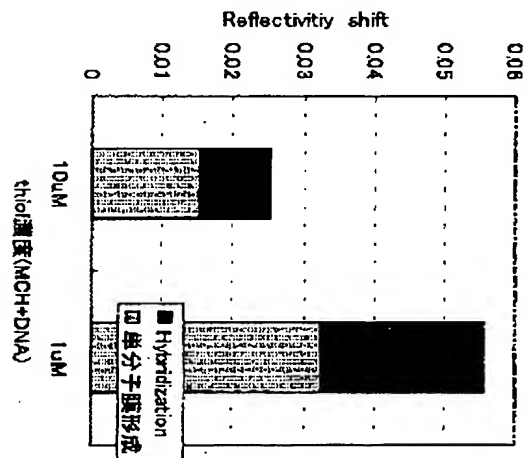


1μMにおけるハイブリダイゼーションの DNAブロー混合比依存性



【図 4】

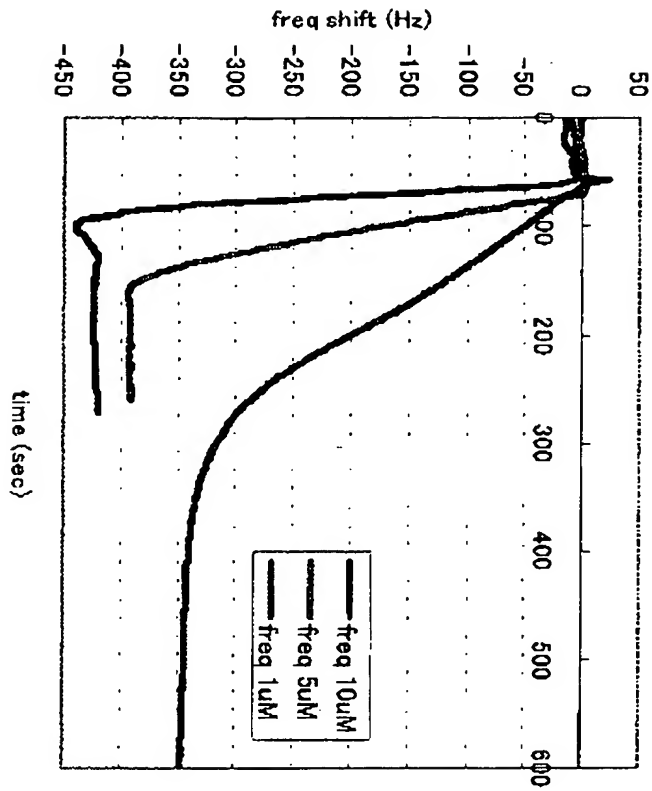
SPR測定結果、濃度依存性



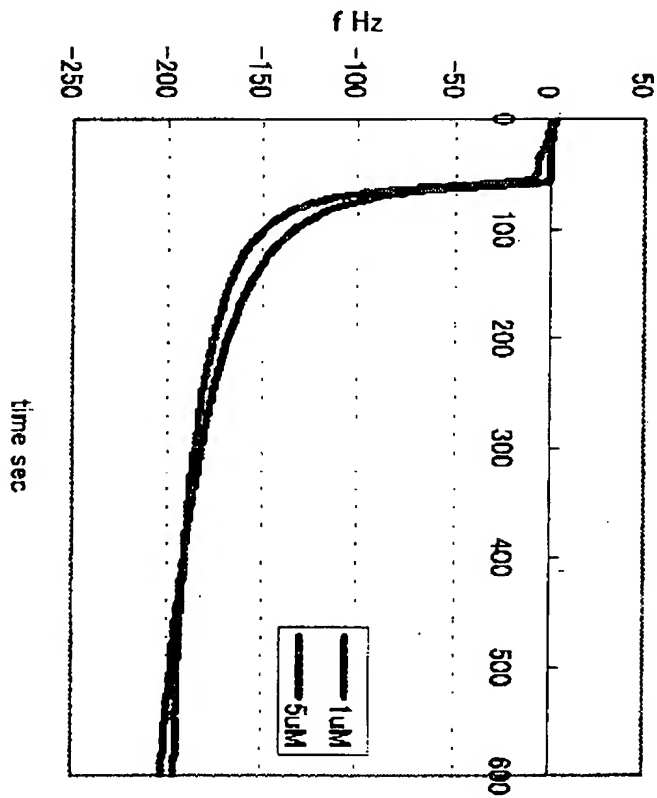
【図 5】

QCM測定結果

MCHの吸着曲線 (濃度依存性)



DNAプロローブの吸着曲線 (濃度依存性)



【図 6】

QCM: 分子吸着による質量増加が周波数の減少として観測される。

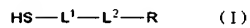
【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 核酸プローブを固相基板表面に固定化するための優れた吸着方法を提供する。

【解決手段】 核酸を固相基板上に固定化するための核酸固定化方法であって、プローブとしての核酸および式

【化1】



〔式中、 L^1 は単結合または C_{1-15} アルキレン基を、 L^2 は核酸、ポリエチレングリコール基、 $-\text{CO}-\text{NH}-$ または $-\text{NH}-\text{CO}-$ を、 R は水酸基、アミノ基、フェロセニル基またはカルボキシル基を示す〕で表される化合物またはその塩を合計濃度で $0.1 \sim 2 \mu\text{M}$ 含む組成物と、前記固相基板とを接触させてインキュベートすること含む、前記核酸固定化方法。

【選択図】 なし

認定・付加情報

特許出願の番号	特願 2 0 0 3 - 0 8 6 3 6 2
受付番号	5 0 3 0 0 4 9 6 3 4 9
書類名	特許願
担当官	第五担当上席 0 0 9 4
作成日	平成 1 5 年 3 月 2 7 日

< 認定情報・付加情報 >

【提出日】	平成15年 3月26日
-------	-------------

次頁無

【書類名】 手続補正書
【整理番号】 J0097966
【あて先】 特許庁長官 殿
【事件の表示】
 【出願番号】 特願2003- 86362
【補正をする者】
 【識別番号】 000002369
 【氏名又は名称】 セイコーエプソン株式会社
【代理人】
 【識別番号】 100079108
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 稲葉 良幸
【手続補正1】
 【補正対象書類名】 特許願
 【補正対象項目名】 発明者
 【補正方法】 変更
 【補正の内容】
 【発明者】
 【住所又は居所】 長野県諏訪市大和3丁目3番5号 セイコーエプソン株式会社内
 【氏名】 瀧口 宏志
 【発明者】
 【住所又は居所】 長野県諏訪市大和3丁目3番5号 セイコーエプソン株式会社内
 【氏名】 福島 均
【提出物件の目録】
 【物件名】 宣誓書 1
 【援用の表示】 平成15年8月28日付け提出の手続補足書に添付のものを援用する。
 【物件名】 誤記理由書 1
 【援用の表示】 平成15年8月28日付け提出の手続補足書に添付のものを援用する。

認定・付加情報

特許出願の番号	特願 2003-086362
受付番号	50301428431
書類名	手続補正書
担当官	鈴木 夏生 6890
作成日	平成15年10月 8日

<認定情報・付加情報>

【提出日】	平成15年 8月28日
【補正をする者】	
【識別番号】	000002369
【住所又は居所】	東京都新宿区西新宿2丁目4番1号
【氏名又は名称】	セイコーエプソン株式会社
【代理人】	申請人
【識別番号】	100079108
【住所又は居所】	東京都港区六本木6-10-1 六本木ヒルズ森 タワー23階 TMI 総合法律事務所
【氏名又は名称】	稲葉 良幸

特願 2 0 0 3 - 0 8 6 3 6 2

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[0 0 0 0 0 2 3 6 9]

1. 変更年月日

1 9 9 0 年 8 月 2 0 日

[変更理由]

新規登録

住 所

東京都新宿区西新宿 2 丁目 4 番 1 号

氏 名

セイコーエプソン株式会社